



B3

(19)

(11) Publication number:

11075896 A

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number:
09234850

(51) Intl. Cl.:
C12Q 1/37

(22) Application date:
29.08.97

(30) Priority:

(43) Date of application publication:
23.03.99

(84) Designated contracting states:

(71) Applicant:
KDK CORP

(72) Inventor:
NANBU MASAKO
FUKUNAGA SATOSHI

(74) Representative:

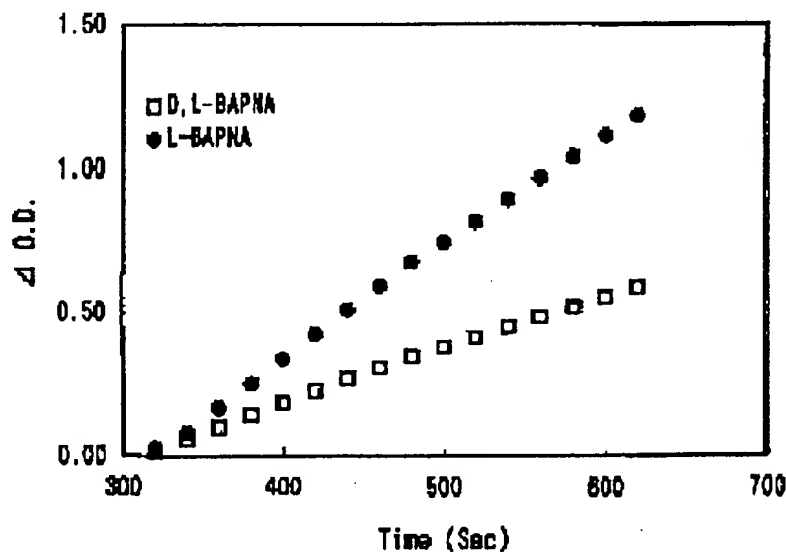
(54) MEASUREMENT OF PROTEASE INHIBITOR AND MEASUREMENT KIT USED THEREFOR

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for measuring a protease inhibitor, enabling to quickly and simply measure UTI (trypsin inhibitor in urine) in high sensitivity.

SOLUTION: This method for measuring a protease inhibitor comprises mixing a urine specimen with a buffer solution, a trypsin solution and a substrate solution and subsequently measuring the activity of the trypsin to measure the concentration of UTI in the urine specimen. Therein, a substrate solution containing only L-BAPNA (benzoyl-arginine-p-nitroanilide) is used as a substrate, and a surfactant is added to at least one of the buffer solution and the enzyme solution. The surfactant is added in an amount of about 1 wt.% based on the total amount of the enzymatic reaction solution. The surfactant includes polyoxyethylene(40) octyl phenyl ether, polyoxyethylene(10) octyl phenyl ether, 3-[(3-colamidopropyl)dimethylammonio]-propanesulfonic acid, 3-[(3-colamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonic acid and polyoxyethylene sorbitan monolaurate. As shown in the graph, the employment of the L-BAPNA improves the sensitivity of the measurement.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO



Applicant: Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd. 000141897
57 Nishi Akita-cho, Higashi Kyu-jo, Minami-
ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu

Agent: Kansai Ikeuchi, Patent Attorney (and 2
others)

Continued on last page

Title of Invention:

Method of measuring protease inhibitors, a measurement kit using it, and
a method of dissolving substrates

Abstract:

Purpose of Invention: To provide a method of manufacturing urinary trypsin inhibitors which has an excellent measurement accuracy and reproducibility, is easy to operate, and does not pose any risk of harming plastic cells.

Means of Solving the Problems of This Invention: A method of measuring urinary trypsin inhibitors by mixing the urine sample, an enzyme solution containing trypsin, and a buffer, adding a substrate solution to this mixture to perform an enzyme reaction, and measuring the enzyme activity. As the aforementioned buffer, a buffer prepared in such a way that it contains calcium in the ranges of 0.15 μmol or more per μg of the trypsin in the reaction solution and 100 μmol or less per ml of the aforementioned urine sample, and, when the aforementioned substrate solution is prepared by dissolving the substrate in an organic solvent and diluting this solution with water, at least one amphoteric or nonionic surface active agent is added to either or both the aforementioned organic solvent and water.

Claims:

- (1) A method of measuring protease inhibitors which is a method in which a protease inhibitor in a sample is measured by compounding and mixing the sample, a protease, calcium, and a substrate and measuring the enzyme activity of the aforementioned enzyme; the proportion of the aforementioned calcium is in the ranges of 0.15 μmol or more per μg of the aforementioned enzyme and 100 μmol or less per ml of the aforementioned urine sample; the method of compounding the aforementioned substrate is that a substrate solution is prepared by dissolving the aforementioned substrate in an organic solvent, diluting this solution with water; and when this dilution is performed, at least one amphoteric or nonionic surface active agent is added to either or both the aforementioned organic solvent and the water.
- (2) A measurement method in accordance with Claim (1), in which a buffer solution is used instead of water in preparing the substrate solution.

(3) A measurement method in accordance with Claim (1) or (2), in which the organic solvent used in preparing the substrate solution is dimethyl sulfoxide.

(4) A measurement method in accordance with any of Claims (1)–(3), in which the protease is trypsin and the substrate is shown by formula (1) below.

protective group – (amino acid residual group)_n – p-nitroanilide (1)

(where n is an integer in the range 1–5)

(5) A measurement method in accordance with Claim (4), in which the substrate is α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide.

(6) A measurement method in accordance with Claim (4) or (5), in which the sample is a urine sample and the protease inhibitor is a urinary trypsin inhibitor.

(7) A measurement method in accordance with any of Claims (1)–(6), in which the surface active agent is a betaine-type amphoteric surface active agent.

(8) A measurement method in accordance with any of Claims (1)–(7), in which the amphoteric surface active agent is at least one of the following: 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid and 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid.

(9) A measurement method in accordance with any of Claims (1)–(7), in which the nonionic surface active agent is at least one of the following: polyoxyethylenesorbitan monolaurate, polyoxyethylenesorbitan monooleate, polyoxyethylene (23) lauryl ether, polyoxyethylene (20) cetyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether, polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyoxyethylene alkyl ethers, perfluoroalkyl polyoxyethylene ethanols, alkyl fluoride esters, polyethylene-glycol mono-p-nonylphenyl ether, polyoxyethylene (30) octylphenyl ether, N,N-bis(3-D-gluconamidepropyl) deoxycolamide, n-octyl- β -D-thioglucoside, and sucrose monolaurate.

(10) A measurement method in accordance with any of Claims (1)–(9), in which the proportions of the ingredients of the substrate solution, with respect to the total quantity of the solution, are 1–50 mmol/l substrate, 1–50 wt % organic solvent, and 0.1–5 wt % surface active agent.

(11) A kit for measuring protease inhibitors, which is a measurement kit for protease inhibitors provided with a protease, a substrate, and calcium, and in which the proportion of the aforementioned calcium is 0.15 mmol or more per mg of the aforementioned enzyme and 100 mmol or less per ml sample; the aforementioned substrate is dissolved in a solution; this solution contains an organic solvent and a surface active agent; and the aforementioned surface active agent is at least one amphoteric or nonionic surface active agent.

(12) A measurement kit in accordance with Claim (11), in which the solution containing the substrate is prepared by dissolving the substrate in an organic solvent and diluting this solution with water, and the aforementioned surface active agent is compounded with either or both the aforementioned organic solvent and water.

(13) A measurement kit in accordance with Claim (11) or (12), in which, when the reaction solution is prepared by compounding the protease, the substrate, the calcium, and the sample, the pH of this reaction solution is in the range of 5–9, the concentration of the aforementioned enzyme in the aforementioned reaction solution is in the range of 5–250 mg/l, and the substrate concentration in the aforementioned reaction solution is 0.5–25 mmol/l.

(14) A measurement kit in accordance with any of Claims (11)–(13), in which the organic solvent of the solution in which the substrate is dissolved is dimethyl sulfoxide.

(15) A measurement kit in accordance with any of Claims (11)–(14), in which the protease is trypsin and the substrate is shown by formula (2) below.

protective group – (amino acid residual group)_n – p-nitroanilide (2)

(where n is an integer in the range 1–5)

(16) A measurement kit in accordance with Claim (15), in which the substrate is α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide.

(17) A measurement kit in accordance with Claim (11)–(16), in which the surface active agent of the solution in which the substrate is dissolved is a betaine-type amphoteric surface active agent.

(18) A measurement kit in accordance with any of Claims (11)–(17), in which the amphoteric surface active agent of the solution in which the substrate is dissolved is at least one of the following: 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid and 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid.

(19) A measurement kit in accordance with any of Claims (11)–(18), in which the nonionic surface active agent of the solution in which the substrate is dissolved is at least one of the following: polyoxyethylenesorbitan monolaurate, polyoxyethylenesorbitan monooleate, polyoxyethylene (23) lauryl ether, polyoxyethylene

(20) cetyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether, polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyoxyethylene alkyl ethers, perfluoroalkyl polyoxyethylene ethanols, alkyl fluoride esters, polyethyleneglycol mono-p-nonylphenyl ether, polyoxyethylene (30) octylphenyl ether, N,N-bis(3-D-gluconamidepropyl) deoxycolamide, n-octyl- β -D-thioglucoside, and sucrose monolaurate.

(20) A measurement kit in accordance with any of Claims (11)–(19), which is provided with the buffer R1, the enzyme solution R2, and the substrate solution R3 mentioned below, in the volume proportions of R1:R2:R3 = 30–90:5–40:5–30.

(R1) A buffer solution containing calcium in the ranges of 0.15 μ mol or more per μ g of the aforementioned enzyme and 100 μ mol or less per ml of the sample.

(R2) An enzyme solution containing the protease.

(R3) A substrate solution containing the substrate, an organic solvent, and a surface active agent; the aforementioned surface active agent is at least one amphoteric surface active agent or nonionic surface active agent.

(21) A method of dissolving the substrate, in which the substrate is dissolved in an organic solvent and this solution is diluted with water, and at least one amphoteric surface active agent or nonionic surface active agent is added to either or both the aforementioned organic solvent or the water.

(22) A method of dissolving the substrate in accordance with Claim (21), in which the dilution is performed with a buffer solution instead of water.

(23) A method of dissolving the substrate in accordance with Claim (21) or (22), in which the organic solvent used in preparing the substrate solution is dimethyl sulfoxide.

(24) method of dissolving the substrate in accordance with any of Claims (21)–(23), in which the substrate is shown by formula (3) below.

protective group – (amino acid residual group)_n – p-nitroanilide (3)

(where n is an integer in the range 1–5)

(25) A method of dissolving the substrate in accordance with any of Claims (21)–(24), in which the surface active agent is a betaine-type amphoteric surface active agent.

(26) A measurement method in accordance with any of Claims (21)–(25), in which the amphoteric surface active agent is at least one of the following: 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid and 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid.

(27) A measurement method in accordance with any of Claims (21)–(26), in which the nonionic surface active agent is at least one of the following: polyoxyethylenesorbitan monolaurate, polyoxyethylenesorbitan monooleate, polyoxyethylene (23) lauryl ether, polyoxyethylene (20) cetyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether, polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyoxyethylene alkyl ethers, perfluoroalkyl polyoxyethylene ethanols, alkyl fluoride esters, polyethyleneglycol mono-p-nonylphenyl ether, polyoxyethylene (30) octylphenyl ether, N,N-bis(3-D-gluconamidepropyl) deoxycolamide, n-octyl-β-d-thiogluco-side, and sucrose monolaurate.

(28) A method of dissolving the substrate in accordance with any of Claims (21)–(27), in which the proportions of the ingredients of the substrate solution, with respect to the total quantity of the solution, are 1–50 mmol/l substrate, 1–50 wt % organic solvent, and 0.1–5 wt % surface active agent.

Detailed Explanation of Invention:

Industrial Field of Application

This invention concerns a method of measuring protease inhibitors, a measurement kit using this method, and a method of dissolving substrates.

Prior Art

Recently, urinary trypsin inhibitors, including urinary trypsin inhibitors (UTI), have been noted as indicators of the condition of the body, and various studies have been performed on them in the field of clinical medicine. For example, it is known that the aforementioned UTI appear in the urine when the body is exposed to endogenous or exogenous stresses, such as inflammations and surgery (T. Kuwajima et al., *Nyōchū toripushin inhibitā no rinshōteki igi* [The clinical significance of urinary trypsin inhibitors], *Japanese Journal of Inflammation*, review article, Vol. 9, No. 3, May 1989).

Since the aforementioned urinary trypsin inhibitors inhibit trypsin activity in correspondence with their quantity, they are measured by measuring the degree of inhibition of trypsin activity. This measurement can be performed, for example, by a method of mixing a urine sample, an enzyme solution containing trypsin, and a buffer, adding a substrate solution to this, and measuring the enzyme reaction.

In this measurement, benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) can be used as the substrate. However, since BAPNA is difficult to dissolve, the substrate solution is prepared by first dissolving BAPNA in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluting this solution approximately 2 times with water. Moreover, when this measurement is performed, calcium, a trypsin activator, is used; ordinarily, the calcium is compounded with the aforementioned buffer.

Problems That the Invention Is to Solve

However, the conventional measuring method has the following problems.

First, if the calcium concentration in the buffer, etc., is low, the effect of the calcium present in the urine sample will be felt from the beginning, and as a result, the trypsin will be activated and the value measured will be lower than the true urinary trypsin inhibitor concentration. Moreover, if an excess quantity of calcium is added, it will react with the carbonate, phosphate, etc., ions in the urine and produce a precipitate, which will affect the measurement. In order to prevent this, a pre-treatment, such as centrifuging, may be performed, but the measurement operation will become more complex.

Next, there is a risk that the organic solvent, such as DMSO, may harm the plastic cells which are generally used in automatic analyzers; therefore, the quantity of the organic solvent used is limited. Consequently, the quantity of the substrate which can be dissolved is also limited, and as a result it becomes more difficult to increase the measurement sensitivity, and there are limits on the simultaneous reproducibility of the measurement. Furthermore, there is a risk that the activity of the trypsin will be limited by the use of the organic solvent. In addition, it is possible to dissolve BAPNA, which is difficult to dissolve, by using an organic solvent, but the results of this use are not sufficient, and when the substrate solution is stored in a cold place for a long period, there is a risk that the BAPNA will crystallize out. Therefore, in the conventional measurement method, when difficult-to-dissolve substances such as BAPNA are employed by

using organic solvents, the substrate solution must be prepared each time it is needed for a measurement, and the measurement must be performed immediately.

Therefore, the purpose of this invention is to provide a method of manufacturing urinary trypsin inhibitors which has an excellent measurement accuracy and simultaneous reproducibility, is easy to operate, and does not pose any risk of harming plastic cells, as well as a measurement kit which uses this method, and a method of dissolving substrates.

Means of Solving These Problems

In order to accomplish this purpose, the method of measuring protease inhibitors of this invention is a method of measuring protease inhibition in samples by mixing the sample, a protease, calcium, and a substrate and measuring the enzyme activity of the aforementioned enzyme. The ranges of the aforementioned calcium are 0.15 μmol or more per μg of the trypsin in the reaction solution and 100 μmol or less per ml of the aforementioned sample. The method of compounding the aforementioned substrate [solution] is to dissolve the substrate in an organic solvent and dilute this solution with water to form the substrate solution. When this dilution is performed, at least one amphoteric or nonionic surface active agent is added to either or both the aforementioned organic solvent and water.

In the measurement method of this invention, in this manner, the proportion of the calcium used is defined, and specific surface active agents are used together with the organic solvent in compounding the substrate [solution]. That is, if the calcium content in the reaction solution is 0.15 μmol or more per μg of the trypsin, the trypsin activity is made constant, so that there is no danger that the effect of the calcium in the urine will be felt. Furthermore, if the calcium content in the reaction solution is 100 μmol or less per ml of the urine sample, a precipitate will not be produced and there is no danger of bad effects on the measurement; in addition, difficult operations such as centrifugation can be eliminated. Furthermore, by using the aforementioned specific surface active agents, the quantity of the organic solvent, such as DMSO, used can be reduced and sufficient quantities of substrates which are difficult to dissolve, such as BAPNA, can be used. As a result, since the quantity of the organic solvent is small, damage to the plastic cells can be prevented, and since a sufficient quantity of substrate can be used, the measurement accuracy is increased and simultaneous reproducibility is improved. Furthermore, the solubility of the substrate can be improved, and crystallization can be prevented, by using specific surface active agents.

In the method of measurement of this invention, one can also use a buffer in place of water in the preparation of the substrate solution, and it is desirable to use DMSO as the organic solvent.

In the measurement method of this invention, it is desirable for the protease to be trypsin, and for the substrate to be the substrate shown by the aforementioned formula. As the aforementioned substrate, α -benzoyl-arginine-p-nitro-

anilide is especially desirable. However, one can also use α -benzoyl-lysine-p-nitroanilide, t-butoxycarbonyl-arginine-p-nitroanilide, and t-butoxycarbonyl-lysine-p-nitroanilide. In this case, moreover, it is desirable for the sample to be a urine sample and for the protease inhibitors to be urinary trypsin inhibitors.

In the measurement method of this invention, it is desirable for the surface active agents to be betaine-type surface active agents.

In the measurement method of this invention, it is desirable for the amphoteric surface active agent to be at least one of the following: 3-[(3-colamide-propyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid and 3-[(3-colamidepropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid.

In the measurement method of this invention, it is desirable for the nonionic surface active agent to be at least one of the following: polyoxyethylenesorbitan monolaurate, polyoxyethylenesorbitan monooleate, polyoxyethylene (23) lauryl ether, polyoxyethylene (20) cetyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether, polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyoxyethylene alkyl ethers, perfluoroalkyl polyoxyethylene ethanols, alkyl fluoride esters, polyethyleneglycol mono-p-nonylphenyl ether, polyoxyethylene (30) octylphenyl ether, N,N-bis(3-D-glucosamidedeopropyl) deoxycolamide, n-octyl- β -D-thioglucoside, and sucrose monolaurate. Examples of the aforementioned polyoxyethylene nonylphenyl ether are Noigen EA-80, Noigen EA-120, and Noigen EA-140 (all products of Daiichi Kogyo Pharmaceutical Co.). Examples of the aforementioned polyoxyethylene alkyl ethers are Softanol [*sofutanōru*] 70, Softanol 90, and Softanol 120 (all products of Nihon Shokubai Co.). An example of the aforementioned perfluoroalkyl polyoxyethylene ethanols is Florad [*furoraado*] FC-170C (3M Co.), and an example of the aforementioned alkyl fluoride esters is Florad FC-430 (3M Co.). An example of the aforementioned polyoxyethylene (30) octylphenyl ether is Triton X-305 (Nakarai Tesuku Co.).

In the measurement method of this invention, the proportions of the ingredients of the substrate solution should be are 1–50 mmol/l substrate, 1–50 wt % organic solvent, and 0.1–5 wt % surface active agent with respect to the total quantity of the substrate.

Next, the kit for measuring protease inhibitors of this invention is a protease inhibitor measurement kit provided with a protease, a substrate, and calcium; the proportion of the aforementioned calcium is 0.15 μ mol or more per μ g of the aforementioned enzyme and 100 μ mol or less per ml of the sample; the aforementioned substrate is dissolved in the solution, and this solution contains an organic solvent and a surface active agent. The aforementioned surface active agent is at least one amphoteric or nonionic surface active agent.

By using this measurement kit, protease inhibitors can be measured in a simple manner, with excellent measurement accuracy and simultaneous reproducibility, and with no risk of damaging the plastic cells.

In the measurement kit of this invention, the solution in which the aforementioned substrate is dissolved is prepared by diluting the substrate in an organic

solvent and diluting this solution with water; it is desirable for either or both the aforementioned organic solvent and water to contain a surface active agent.

In the measurement kit of this invention, the reaction solution is prepared by compounding together the protease, the substrate, the calcium, and the sample; the pH of this reaction solution is in the range of 5–9, the concentration of the aforementioned enzyme in the aforementioned reaction solution is in the range of 5–250 mg/l, and the substrate concentration in the aforementioned reaction solution is 0.5–25 mmol/l.

In the measurement kit of this invention, it is desirable to use DMSO as the organic solvent and to use a substrate shown by formula (2) above as the substrate. It is especially desirable to use α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide as the substrate.

In the measurement kit of this invention, it is desirable to use the same surface active agents as were mentioned above concerning the measurement method of this invention.

A desirable form of the measurement kit of this invention is one which contains the buffer R1, the enzyme solution R2, and the substrate solution R3 mentioned below, in the volume proportions of $R1:R2:R3 = 30-90:5-40:5-30$.

(R1) A buffer solution containing calcium in the ranges of 0.15 μ mol or more per μ g of the aforementioned enzyme and 100 μ mol or less per ml of the sample.

(R2) An enzyme solution containing the protease.

(R3) A substrate solution containing the substrate, an organic solvent, and a surface active agent; the aforementioned surface active agent is at least one amphoteric surface active agent or nonionic surface active agent.

Furthermore, in the measurement kit of this invention, the calcium may be contained in the aforementioned enzyme solution R2 or the substrate solution R3 instead of the aforementioned buffer R1, as long as it has the specific concentration measured above. Furthermore, the calcium may also be contained, in the aforementioned specific concentration, partly in the aforementioned buffer R1 and partly in the aforementioned enzyme solution R2, or partly in the buffer R1 and partly in the substrate solution R3, or partly in the enzyme solution R2 and partly in the substrate solution R3, or partly in the buffer R1, partly in the enzyme solution R2, and partly in the substrate solution R3. Moreover, in the measurement kit of this invention, the aforementioned R1, R2, and R3 may be independent of each other, or it may combine a mixture of any two of the solutions with the third solution. Specifically, the following three combinations may be used:

- (1) A mixture of R1 and R2 + R3
- (2) A mixture of R1 and R3 + R2
- (3) A mixture of R2 and R3 + R1

In combination (3), furthermore, the enzyme and the substrate can be mixed, if the enzyme concentration is controlled by regulating the pH, etc.

Next, the method of dissolving the substrate of this invention is a method in which the substrate is dissolved in an organic solvent and this solution is diluted with water; at least one amphoteric surface active agent or nonionic surface active agent is added to either or both the aforementioned organic solvent or the water.

The method of dissolving the substrate of this invention is not limited to the aforementioned protease substrates; it can be applied to the dissolution of various kinds of substrates.

In the method of dissolving the substrate of this invention, a buffer may be used instead of the water, in the same manner as was mentioned above, and it is desirable to use DMSO as the organic solvent.

In the method of dissolving the substrate of this invention, the substrates and surface active agents which are desirable for use are the same as those mentioned above.

In the method of dissolving the substrate of this invention, the proportions of the ingredients of the substrate solution, with respect to the total quantity of the solution, are 1–50 mmol/l substrate, 1–50 wt % organic solvent, and 0.1–5 wt % surface active agent.

Practical Form of This Invention

Next, this invention will be explained in more detail.

The method of measuring protease inhibitors of this invention can be performed, for example by using a protease solution, a substrate solution prepared by using an organic solvent and specific surface active agents, and a buffer solution with a specific calcium concentration range.

The enzyme mentioned above may be, for example, trypsin. This trypsin is not particularly limited; for example, one can use bovine pancreatic trypsin, porcine pancreatic trypsin, etc. A suitable trypsin concentration is determined by the specific activity of the trypsin, but it is ordinarily 10–500 mg/l, preferably 20–100 mg/l, with respect to the total enzyme solution. Moreover, the pH of this enzyme solution may be adjusted to 2.0–3.0 with hydrochloric acid or a buffer in order to prevent autodigestion of the trypsin.

Furthermore, chymotrypsin may also be used as another protease. An example of a substrate which can be used with chymotrypsin is benzoyl-tyrosine-p-nitroanilide.

Next, the surface active agents used in the aforementioned substrate solution are, as mentioned above, amphoteric and/or nonionic surface active agents. Preferable surface active agents are as mentioned above; especially desirable ones, from the point of view of obtaining still more excellent effects from this invention, are 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid

(CHAPS) and 3-[(3-colamidepropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonic acid (CHAPSO). In this invention, the aforementioned surface active agents may be used individually or in combinations of 2 or more kinds.

Moreover, as the substrate of this substrate solution, as mentioned above, substrates shown by the aforementioned formula (1) are desirable, and the aforementioned α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide is especially desirable.

Furthermore, as the aforementioned organic solvent, besides the aforementioned DMSO, one can use, for example, dimethylformamide (DMF).

In this invention, the organic solvent in which the substrate is dissolved is diluted with water or a buffer. In this dilution, whether one uses water or a buffer, and which kind of buffer is used, is decided by the measurement conditions, etc. Examples of buffers which can be used are triethanolamine hydrochloride buffer solution, tris-hydrochloric acid buffer solution, phosphate buffer solution, glycine buffer solution, Veronal hydrochloric acid, Good's [guddo] buffer solution, etc. The pH of these buffer solutions is decided according to the kind of enzyme used, etc.

The preparation of the substrate solution of this invention is performed, for example, in the following manner. First, the substrate is dissolved in an organic solvent. The concentration at this time is ordinarily in the range of 1–50 mg per 1 mg DMSO. Otherwise, the aforementioned specific surface active agents may be dissolved in water or a buffer solution to prepare a surface active agent solution. The concentration in this case is determined by the kind of surface active agent used, but ordinarily it is in the range of 0.1–5 wt % of the water or buffer solution. Then, the substrate solution is prepared by diluting the aforementioned organic solvent with the aforementioned surface active agent solution. The dilution rate is ordinarily 2–20 times, preferably 10–20 times. Furthermore, the surface active agent is ordinarily compounded with the water or buffer solution, but it may also be compounded with the organic solvent.

Next, in this example, the calcium is added to the buffer solution; the concentration is in the range mentioned above, preferably 0.2 μ mol or more per μ g of the aforementioned enzyme, and 50 μ mol or less per ml of the sample. The pH of this buffer solution should be within a range such that the aforementioned pH of the enzyme reaction solution is produced, preferably pH 7–8. Moreover, the kind of buffer solution used may be a triethanolamine hydrochloride buffer solution, tris-hydrochloric acid buffer solution, phosphate buffer solution, Good's buffer solution, etc. This buffer solution is prepared by an ordinary method.

Next, the method of measurement of this invention is performed in the following way, in the case in which urinary trypsin inhibitors, for example, are the object of measurement.

First, the urine sample, the buffer solution, and the enzyme solution are mixed. The proportions (weight ratios) in this case are ordinarily set within the ranges of urine solution : buffer solution : enzyme solution = 1:5–10:2–5. Next, this mixture is incubated; the incubation conditions are ordinarily 1–5 minutes at

25–37°C. The aforementioned substrate solution is then compounded with the result of this incubation, causing a reaction between the aforementioned enzyme and substrate. The proportion of this composition is ordinarily in the range of 5–30 vol % with respect to the whole reaction solution. The reaction conditions are ordinarily 1–10 minutes at 25–37°C. Moreover, the pH of the reaction solution at this time varies with the kind of enzyme used, etc., but in the case of trypsin, which is presently under discussion, it is in the range of pH 7–8. Furthermore, the enzyme reaction is detected by using a specific method, and the enzyme activity is measured. In this reaction, the enzyme reaction is inhibited corresponding to the quantity of trypsin inhibitors in the aforementioned urine sample. Therefore, by making a calibration curve beforehand, using known urinary trypsin inhibitors, the quantity of urinary trypsin inhibitors can be measured. The method of detecting the aforementioned enzyme reaction may be to measure the degree of color which is produced when the enzyme reaction occurs by means of a spectrophotometer, etc. Otherwise, the enzyme activity can be measured by measuring the concentration of the reaction product.

Next, the measurement kit of this invention is provided, for example, with the aforementioned buffer solution R1, enzyme solution R2, and substrate solution R3. The preparation of these reagents R1, R2, and R3, can be performed by the methods described in the explanation of the measurement method of this invention, and the compositions and their proportions are as described above. By using this measurement kit, the measurement of the protease inhibitors, such as urinary trypsin inhibitors, can be performed in a simple and rapid manner.

Next, in the method of dissolution of the substrate of this method, the substrates used may be, besides the examples given above, Z-glycine-glycine-leucine-p-nitroanilide or succinyl-alanine-alanine-alanine-p-nitroanilide. Moreover, the enzymes used in the method of dissolving the substrate in this invention are not particularly limited; one may use, for example, trypsin, chymotrypsin, elastase, subtilisin, plasmin, thrombin, kallikrein, cathepsin B, endopeptidase, or urokinase.

The method of dissolving the substrate of this invention and measuring it as the same as was described in the explanation of the measurement method given above.

Working Examples

Next, working examples of this invention will be explained.

Working Example 1

The buffer solution R1, enzyme solution R2, and substrate solution R3 were prepared as described below.

Buffer solution R1: The following ingredients were mixed with purified water in the proportions shown below to prepare a buffer solution (pH 7.8), by the ordinary method.

Triethanolamine hydrochloride	0.2 mol/l
CaCl ₂	0.003 mol/l

Enzyme solution R2: The following ingredients were mixed in the proportions shown below to prepare an enzyme solution, by the ordinary method.

Bovine pancreatic trypsin	50 mg/l
(Type III, 10,000–13,000 BAEE units/mg, Sigma Co.)	
Hydrochloric acid	1.2 mmol/l

Substrate solution R3: The necessary quantity of BAPNA was dissolved in DMSO and the result was diluted 10 times with an aqueous solution of a specific surface active agent to prepare 4 kinds of substrate solution (a–d). Furthermore, for comparison, a substrate solution was prepared in the same manner except that no surface active agent was included. These compositions are shown below.

Substrate solution (a)

BAPNA	500 mg
DMSO	10 ml
CHAPSO	2.6 g
Purified water	90 ml

Substrate solution (b)

BAPNA	500 mg
DMSO	10 ml
CHAPSO	1.3 g
Purified water	90 ml

Substrate solution (c)

BAPNA	500 mg
DMSO	10 ml
CHAPS	2.6 g
Purified water	90 ml

Substrate solution (d)

BAPNA	500 mg
DMSO	10 ml
CHAPS	1.3 g
Purified water	90 ml

Substrate solution (comparison)

BAPNA	500 mg
-------	--------

DMSO	50 ml
Purified water	50 ml

Besides this, aqueous solutions of urinary trypsin inhibitor (UTI, Miraclid [*mirakuriddo*], Mochida Pharmaceutical Co.) were prepared with 3 concentrations, 0 U/ml, 100 U/ml, and 200 U/ml, and were used as samples.

Next, 0.14 ml of each sample, 1.8 ml buffer solution R1 and 0.48 ml enzyme solution R2 were mixed and kept at 37°C for 1 minute, after which 0.58 ml of the aforementioned substrate solution R3 was added and the reaction was started. The changes in absorbance (405 nm) within 100 seconds were measured by means of a spectrophotometer and relative absorbances ($\Delta O.D.$) were obtained to make the calibration curves shown by the graph in Fig. 1.

From these results it can be seen that, if the specified surface active agents are used in preparing the substrate solution, the enzyme activity of the trypsin is increased. Furthermore, the enzyme activity is increased further by using a larger quantity of surface active agent in the composition.

Furthermore, in preparing the substrate solutions of this working example, the quantity of DMSO used can be reduced by using the specified surface active agents, a sufficient quantity of substrate can be dissolved, and crystallization and precipitation of the substrate can be prevented.

Working Example 2

Using urine samples from 5 healthy subjects (A, B, C, D, and E), and the same buffer solution R1, enzyme solution R2, and substrate solution R3 (a) as in Working Example 1, UTI measurements were performed 3 times in the same manner as in Working Example 1 and the UTI quantities were obtained by using the calibration curve from Working Example 1. The results are shown in Table 1.

	A	B	C	D	E
Measurement values	11.9	22.1	19.2	8.3	2.5
(U/ml)	11.1	22.3	19.2	7.7	4.7
	12.9	21.6	18.7	3.1	3.7

It can be seen from Table 1 that reliable UTI values could be obtained by this measurement. Furthermore, this measurement was not obstructed by precipitation, etc.

Working Example 3

Eighteen substrate solutions were prepared in the same manner as in the working examples given above by using, as the surface active agents, polyoxyethylenesorbitan monolaurate, polyoxyethylenesorbitan monooleate, polyoxy-

ethylene (23) lauryl ether, polyoxyethylene (20) cetyl ether, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether, Softanol [sofutanōru] 70 (Nihon Shokubai Co.), Softanol 90 (Nihon Shokubai Co.), Softanol 120 (Nihon Shokubai Co.), Noigen EA-80 (Daiichi Kogyo Pharmaceutical Co.), Noigen EA-120 (Daiichi Kogyo Pharmaceutical Co.), Noigen EA-140 (Daiichi Kogyo Pharmaceutical Co.), Florad [furoraado] FC-170C (3M Co.), Florad FC-430 (3M Co.), polyethyleneglycol mono-p-nonylphenyl ether, Triton X-305 (Nakarai Tesuku Co.), N,N-bis(3-D-gluconamidepropyl) deoxycolamide, n-octyl- β -D-thioglucoside, and sucrose monolaurate. The composition of the substrate solution was as follows:

BAPNA	500 mg
DMSO	10 ml
Surface active agent	2.6 g
Purified water	90 ml

Next, the solubility of the substrate was investigated for the substrate solutions mentioned above. That is, when the aforementioned substrate solutions were left standing for 24 hours at 4°C, no crystallization and precipitation of the substrate was produced. From this result, it was concluded that sufficient quantities of the substrates can be dissolved with a low concentration of DMSO whichever of the aforementioned nonionic surface active agents was used. Furthermore, when a comparison experiment was performed by not adding a nonionic surface active agent, crystallization and precipitation of BAPNA were produced.

Next, among the substrate solutions prepared in this manner, the one in which polyoxyethylenesorbitan monolaurate was used was taken as the substrate solution R3. After a calibration curve was made in the same manner as in Working Example 1, the UTI quantity was measured for a human urine sample in the same manner as in Working Example 2; as a result, the UTI quantity was 29.0 U/ml. In this measurement, no precipitate was produced, and the UTI quantity obtained was reliable.

Effects of Invention

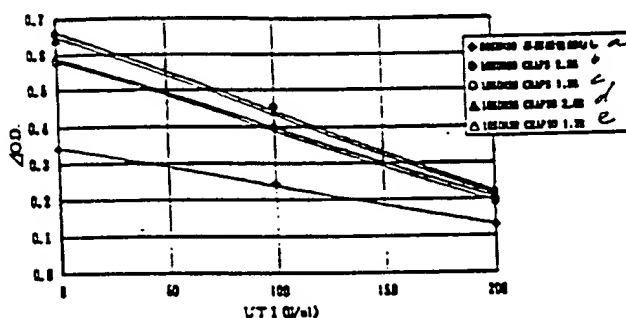
As discussed above, by using the method of measuring protease inhibitors of this invention, it is possible to obtain excellent measurement accuracy and simultaneous reproducibility; the operation of the method is simple, and there is no risk of harming the plastic cells. That is, since the calcium concentration is specified, a lower value than the true one is not obtained, and no precipitate, which causes measurement error, is produced. Furthermore, by using the specified surface active agents, the quantity of organic solvent used, which has a bad effect on the enzyme activity of the trypsin, etc., can be reduced, and a sufficient quantity of substrate can be added. Furthermore, since the enzyme activity of the trypsin, etc., is higher than in the prior art, the measurement sensitivity is improved, as well as the simultaneous reproducibility. In addition, since no precipitate is produced, pre-treatments such as centrifugation are not needed, and since the solubility of the substrate is improved, a large quantity of substrate solution can be prepared at one time, and the operation of the method is simplified when

compared with the prior art, in which it needed to be prepared specially for each measurement. Furthermore, by using the measurement kit of this invention, the work involved in preparing each reagent can be reduced and measurements can be performed in a short time and in a simple manner. In addition, the method of dissolving the substrate in this invention is not limited to substrates of proteases such as trypsin; it can also be applied to various other kinds of substrates.

Brief Explanation of Drawings

Fig. 1: graph showing calibration curves of UTI in the first working example of this invention.

Fig. 1



- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| a. 50% DMSO; no surface active agent | d. 10% DMSO; 2.6% CHAPSO |
| b. 10% DMSO; 2.6% CHAPS | e. 10% DMSO; 1.3% CHAPSO |
| c. 10% DMSO; 1.3% CHAPS | |

Continuation of first page

Inventor:

Goji Fukunaga
Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.
57 Nishi Akita-cho, Higashi Kyu-jo, Minami-
ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-75896

(43)公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 Q 1/37
// G 0 1 N 33/15

識別記号

F I
C 1 2 Q 1/37
G 0 1 N 33/15

Z

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平9-234850

(22)出願日 平成9年(1997) 8月29日

(71)出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72)発明者 南部 昌子

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72)発明者 福永 悟志

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

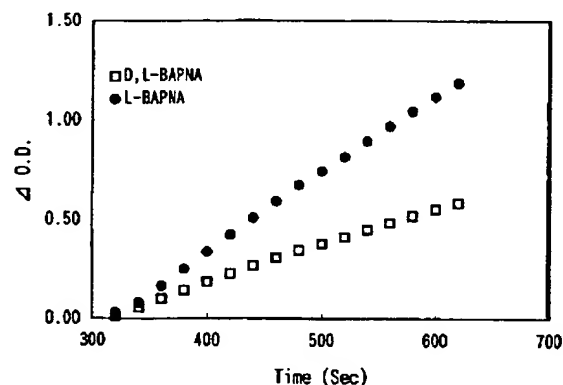
(74)代理人 弁理士 池内 寛幸 (外2名)

(54)【発明の名称】 タンパク質分解酵素阻害物質の測定方法およびそれに用いる測定キット

(57)【要約】

【課題】 迅速かつ簡便に高感度でU T Iを測定することが可能な測定方法を提供する。

【解決手段】 尿試料、緩衝液、トリプシン溶液および基質溶液を混合し、トリプシンの活性を測定することにより前記尿試料中のU T I濃度を測定する方法において、前記基質として、L-BAPNAのみの基質溶液を用い、前記界面活性剤を前記緩衝液および酵素液の少なくとも一方に配合する。界面活性剤の配合割合は、酵素反応液全体の約1重量%である。界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン(40)オキソフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(10)オキソフェニルエーテル、3-[(3-アミドプロピル)ジメチルアモニウム]プロパンスルホン酸、3-[(3-アミドプロピル)ジメチルアモニウム]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸およびポリオキシエチレンオキソフェニルエーテルが使用できる。図1のグラフに示すように、L-BAPNAを用いれば、測定感度が向上する。



【請求項17】 カルシウムをさらに備え、測定対象試料が尿であり、タンパク質分解酵素がトリプシンであり、タンパク質分解酵素阻害物質が尿中トリプシンインヒビター(UTI)である請求項9～16のいずれか一項に記載の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、タンパク質分解酵素阻害物質の測定方法およびそれに用いる測定キットに関する。

【0002】

【従来の技術】最近、尿中トリプシンインヒビター(UTI)が、生体の状態を表す指標として注目され、臨床医学の分野において様々な研究がされている。UTIは、例えば、生体が炎症や外科手術等の内的外的ストレスに晒された場合や感染症に罹った場合に尿中出现することが知られている(「尿中トリプシンインヒビターの臨床的意義」 桑島士郎ら、JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION REVIEW ARTICLE, VOL9, NO. 3, MAY 1989)。

【0003】しかしながら、このような有用性を指摘されながら、従来のUTIの測定方法は、感度が十分でないため、UTIを臨床医学などの分野において十分に活用できていなかった。

【0004】すなわち、UTIは、その量に応じてトリプシン活性を阻害するため、その測定はトリプシン活性の阻害程度を測定することにより行われる。この測定としては、例えば、尿試料、トリプシンを含有する酵素液および緩衝液を混合し、これに基質溶液を添加して酵素反応を測定する方法があげられる。また、この測定の際に、通常、トリプシン活性化剤であるカルシウムが使用され、通常、カルシウムは前記緩衝液中に配合される。

【0005】この測定において、基質として、ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド(BAPNA)が広く使用されている。この基質はトリプシンにより切断されると発色し、これを吸光度の変化量として分光光度計で測定することにより、トリプシンの活性が測定されるのである。しかし、この合成基質は難溶性であり1.0g/L以上の濃度の基質溶液を調製することは困難であるため、酵素活性は基質濃度に依存し、トリプシンの活性を向上させることが難しかった。一方、UTIは極めて少量でトリプシンを阻害する。前述のようにUTIの測定は、トリプシン活性の阻害程度の測定であるから、トリプシン活性が高感度で測定できなければ、UTIの測定も高感度で行うことはできない。

【0006】この問題を解決するために、BAPNAを極性有機溶媒に溶解し、これを水で約2倍に希釈して基質溶液が調製されていた。しかし、これらの有機溶媒の使用により、前記測定方法の自動分析機への適用が難しくなり、また前記有機溶媒によって、自動分析装置一般

に使用されるプラスチックセルを傷めるおそれもある。さらに、前記有機溶媒が、トリプシン等のタンパク質分解酵素の活性を阻害する可能もある。この他、前記有機溶媒を使用して基質溶液を調製したとしても、これを長期間保存したり冷蔵保存すると、前記基質が結晶析出するおそれがある。このため、従来の測定方法では、BAPNA等の難溶性基質を前記有機溶媒を用いて溶解する場合、測定毎に基質溶液を調製し、その後直ちに測定する必要があった。また、有機溶媒を用いて基質溶液を調製したとしても、UTIの測定感度は十分ではなかった。

【0007】そこで、本発明の目的は、極性有機溶媒を用いることなく高感度でタンパク質分解酵素阻害物質を簡便かつ迅速に測定できる測定方法を提供することである。

【0008】前記目的を達成するために、本発明者らは、下記に示す第1番目の測定方法、第2番目の測定方法および第3番目の測定方法を開発した。

【0009】すなわち、第1番目の測定方法は、試料、タンパク質分解酵素および基質を液中で混合し、前記酵素の活性を測定することにより前記試料中のタンパク質分解酵素阻害物質を測定する方法であって、前記基質として、基質中のアミノ酸残基がL型のみである基質を溶解した基質溶液を用いる方法である。

【0010】すなわち、一般に、タンパク質分解酵素の活性の測定において用いられる合成基質は、D、L複合体であるが、この合成基質に対し、アミノ酸残基がL型のみである基質は、溶解性に優れ、有機溶媒を用いることなく水やお湯で十分量を溶解できる。この原因は明らかでないが、この事実は、本発明者らが確認したものである。例えば、D、L-BAPNAは温水を用いても1g/L以上の濃度で溶解させることは困難であるが、L-BAPNAは、温水に10g/Lの高濃度で溶解させることができる。さらに、アミノ酸残基がL型のみである基質を用いることで、タンパク質分解酵素の活性を向上することもできる。この原因も明らかではないが、本発明者らは、酵素反応に寄与しないD型が排除されることによりL型の濃度が相対的に増加したという理由だけでなく、D型アミノ酸残基の酵素阻害も排除されたためと推察している。

【0011】つぎに、本発明の第2番目の測定方法は、試料、タンパク質分解酵素、基質および界面活性剤を液中で混合し、前記酵素の酵素活性を測定することにより前記試料中のタンパク質分解酵素阻害物質を測定する方法であって、前記界面活性剤が前記液中への配合前において前記基質と共存しないという方法である。

【0012】すなわち、この測定方法では、界面活性剤を用いることによりタンパク質分解酵素活性を向上させ、この結果、その阻害物質の測定感度を向上させる。ただし、酵素反応液調製前において、界面活性剤を基質

溶液中に配合するなどして基質と共存させてはいけな
い。したがって、界面活性剤は、緩衝液若しくは酵素液
等の基質溶液とは別の試薬液に配合するか、または別個
に酵素反応液に配合する必要がある。このような態様で
界面活性剤を配合することでタンパク質分解酵素の活性
が向上する理由は、明らかでないが、その向上は顕著で
ある。

【0013】なお、本発明において、酵素反応液とは、
酵素および基質が存在し、酵素反応が生起する液をい
う。したがって、酵素および基質が共存しても、pH等
の調整により酵素反応が生じない液は、酵素反応液とは
いわない。

【0014】つぎに、本発明の第3番目の測定方法は、
試料、タンパク質分解酵素、基質および界面活性剤を液
中で混合し、前記酵素の酵素活性を測定することにより
前記試料中のタンパク質分解酵素阻害物質を測定する方
法であって、前記基質として、アミノ酸残基がL型のみ
である基質を溶解した基質溶液を用い、前記界面活性剤
が前記液中への配合前において前記基質溶液中には存在
しない測定方法である。

【0015】すなわち、この第3番目の測定方法は、前
記第1番目の測定方法と前記第2番目の測定方法とを組
み合わせた方法であり、測定感度が極めて高い方法であ
る。

【0016】本発明の測定方法において、界面活性剤の
酵素反応液中の濃度は0.01~2%であることが好ま
しく、さらに好ましくは、0.05~0.5%である。

【0017】本発明の測定方法において、前記基質は、
前記の式(化1)で表される基質であることが好まし
い。この基質としては、 α -ベンゾイル-L-アルギニン
-p-ニトロアニリドが好ましい。

【0018】本発明の測定方法において、界面活性剤
は、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポ
リオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリオキシ
エチレンソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノ
パルミテート、ソルビタンモノオレート、ソルビタンモ
ノラウレート、ポリオキシエチレン(10)オクチルフ
ェニルエーテル、ポリオキシエチレン(30)オクチル
フェニルエーテル、ポリオキシエチレン(40)オクチ
ルフェニルエーテル、1-O-n-オクチル- β -D-
グルコピラノシド、スクロースモノラウレート、3-
[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-ア
ロパンスルホン酸、3-[(3-コラミドプロピル)ジ
メチルアンモニオ]-2-ハイドロキシプロパンスルホ
ン酸、臭化セチルトリメチルアンモニウム、水酸化ベン
ジルトリメチルアンモニウムからなる群から選択された
少なくとも一つであることが好ましい。

【0019】本発明の測定方法において、タンパク質分
解酵素がトリプシンであり、試料が尿であり、タンパク
質分解酵素阻害物質が尿中トリプシンインヒター(U

TI)であり、カルシウム存在下で酵素活性を測定する
ことが好ましい。

【0020】つぎに、本発明のタンパク質分解酵素阻害
物質の測定キットは、前記3種類の本発明の測定方法に
対応して、以下に示す第1番目、第2番目および第3番
目の3種類の測定キットがある。

【0021】まず、前記第1番目の測定キットは、タン
パク質分解酵素および基質を備えたタンパク質分解酵素
阻害物質の測定キットであって、前記基質が、アミノ酸
残基がL型のみである基質を溶解した基質溶液である。

【0022】また、前記第2番目の測定キットは、タン
パク質分解酵素、基質および界面活性剤を備えたタンバ
ク質分解酵素阻害物質の測定キットであって、前記3試
薬の混合前において前記界面活性剤が前記基質と共存し
ていない。

【0023】そして、前記第3番目の測定キットは、タ
ンパク質分解酵素、基質および界面活性剤を備えたタン
パク質分解酵素阻害物質の測定キットであって、前記基
質は、光学活性がL型のアミノ酸残基のみからなる基質
を溶解した基質溶液であり、前記界面活性剤が前記基質
溶液中に存在していない。

【0024】このような本発明の測定キットを使用する
ことにより、タンパク質分解酵素阻害物質を迅速かつ簡
便に高感度で測定できる。

【0025】本発明の測定キットにおいて、緩衝液(R
1)、タンパク質分解酵素液(R2)、基質溶液(R
3)を備えた、タンパク質分解酵素阻害物質の測定キッ
トであって、緩衝液(R1)およびタンパク質分解酵素
液(R2)の少なくとも一方の液の中に界面活性剤が含有
されていることが好ましい。

【0026】この測定キットにおいて、前記R1、R2
およびR3は、それぞれ独立していてもよく、前記三
種類の液のうちいずれか二種類の液の混合液と他の一種
の液との組み合わせであってもよい。具体的には下記の三
通りの組み合わせがある。

- (1) R1とR2との混合液+R3
- (2) R1とR3との混合液+R2
- (3) R2とR3との混合液+R1

【0027】なお、上記組み合わせ(3)において、例
えば、pHの調整等により酵素反応を制御すれば、酵素
と基質とを混合することができる。

【0028】本発明の測定キットにおいて、界面活性剤
の濃度が、酵素反応液中で0.01~2%の濃度範囲と
なるように調整されていることが好ましい。さらに、
0.05~0.5%に調整されていることが好ましい。

【0029】本発明の測定キットにおいて、好ましい基
質および界面活性剤は、本発明の測定方法の箇所で述べ
たものと同じである。

【0030】本発明の測定キットにおいて、さらにカル
シウムを備え、測定対象試料が尿であり、タンパク質分

解酵素がトリプシンであり、タンパク質分解酵素阻害物質が尿中トリプシンインヒビター (UTI) であることが好ましい。このキットにより、UTI の測定を迅速かつ簡便に高感度で行うことが可能になる。

【0031】

【発明の実施の形態】つぎに、本発明を詳しく説明する。

【0032】本発明のタンパク質分解酵素阻害物質の測定方法は、例えば、タンパク質分解酵素液と、アミノ酸残基がL型のみの基質を用いた基質溶液と、緩衝液とを用いて実施できる。

【0033】前記酵素としては、例えば、トリプシンがあげられる。このトリプシンは、特に限定するものでなく、例えば、牛膵臓由来のトリプシン、ブタ膵臓由来のトリプシンがあげられる。また、トリプシン濃度は、その比活性等により適宜決定されるが、酵素液全体に対し、通常、1～500mg/L、好ましくは10～100mg/Lである。また、この酵素液は、トリプシンの自己消化を防止する目的で、塩酸または緩衝液によりpH2.0～3.5に調整してもよい。

【0034】なお、トリプシン以外のタンパク質分解酵素としては、例えば、キモトリプシンがあげられる。そして、キモトリプシンに使用する基質としては、例えば、ベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリドがあげられる。

【0035】基質溶液は、アミノ酸残基がL型の基質の溶液である。前記基質の好ましいものは、先に述べたとおりであるが、この他に、例えば、Z-グリシン-グリシン-L-ロイシン-p-ニトロアニリド、サクシニル-L-アラニン-L-アラニン-L-アラニン-p-ニトロアニリドがあげられる。このような、アミノ酸残基がL型のみの合成基質は、一般に市販されており（例えば、シグマ社から市販のもの）、またD、L複合体を光学活性クロマトグラフィー等で分割することによっても得ることできる。基質濃度は、通常、1～10g/Lの範囲である。また、この基質溶液の調製に用いる溶媒は、通常、水（精製水等）であるが、後述する緩衝液でもよい。また、基質溶液は、例えば、水等の前記溶媒を加温し、これに基質を加えることにより調製できる。

【0036】つぎに、前記緩衝液は、特に制限するものではなく、例えば、トリエタノールアミン塩酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、グッド緩衝液等があげられる。この緩衝液は、常法により調製される。この緩衝液のpHは、これを用いる酵素の最適pHにより決定されるが、例えば、トリプシンに使用する場合、pH7～8が好ましい。また、トリプシンインヒビターを測定する場合は、通常、カルシウムを緩衝液中に配合する。その割合は、通常、0.01～0.5重量%である。

【0037】そして、本発明では、界面活性剤を使用す

ることが一つの特徴であるが、その種類は問わず、イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。また、その使用量も界面活性剤の種類により最適範囲が適宜決定される。

【0038】前記イオン性界面活性剤としては、例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム、水酸化ベンジルトリメチルアンモニウムがあげられる。この使用量は、通常、0.01～2重量%である。

【0039】前記非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン(40)オクチルフェニルエーテル（例えば、TRITON X-405、ナカライテスク社製）、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル（例えば、TRITON X-100、ナカライテスク社製）、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（例えば、Tween 20、ナカライテスク社製）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（例えば、Tween 80、ナカライテスク社製）があげられる。この使用量は、通常、0.01～2重量%である。

【0040】前記両性界面活性剤としては、例えば、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-プロパンスルホン酸（例えば、CHAPS、同仁化学社製）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（例えば、CHAPSO、同仁化学社製）があげられる。この使用量は、通常、0.01～2重量%である。

【0041】この界面活性剤は、通常、緩衝液中に配合されるが、これに限定されず、酵素液に配合されたり、若しくは界面活性剤溶液として単独で酵素反応液に配合される場合もある。但し、基質溶液に配合することはできない。基質溶液に配合して酵素反応液調製前に基質と共存させると、タンパク質分解酵素の活性を向上させることができないからである。

【0042】つぎに、本発明の測定方法は、例えば、UTIを測定対象とした場合、つぎのようにして行われる。

【0043】すなわち、まず、尿試料、緩衝液および酵素液の三者を混合する。この割合（体積比）は、通常、尿試料：緩衝液：酵素液＝1：5～20：2～10の範囲に設定される。ついで、これをインキュベーションする。このインキュベーションの条件は、通常、25～37℃で1～5分間である。そして、これに、前記基質溶液を配合し、前記酵素と基質を反応させる。この配合割合は、通常、全反応液に対し、体積比5～30%の範囲である。この反応条件は、通常、25～37℃で1～20分間である。また、このときの反応液のpHは、酵素の種類等により異なるが、この例のトリプシンの場合、pH7～8が好ましい。そして、所定の方法により、酵素反応を検出し、酵素活性を測定する。この反応において、前記尿試料中のUTIの量に応じ、酵素反応が阻害

される。したがって、予め、既知のUTIを用いて検量線を作成しておけば、酵素活性の測定により、UTIの量を測定することができる。前記酵素反応の検出方法としては、例えば、BAPNA等のような基質として酵素反応により発色するものを用いた場合は、この発色の程度を分光光度計等により測定する方法があげられる。この他に、反応生成物の濃度を測定することにより、酵素活性を測定することもできる。

【0044】つぎに、本発明の測定キットは、例えば、前記R1の緩衝液、前記R2の酵素液および前記R3の基質溶液を備えるものがあげられる。これらの試薬(R

(緩衝液R1: pH8.1)
トリエタノールアミン塩酸塩
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

【0048】

(酵素液R2)
トリプシン(シグマ社製)
HCl

【0049】(基質液R3) 約70℃に加熱した水に、1g/Lの割合でL-BAPNA(ペプチド研究所製、以下同じ)を溶解することにより調製した。

【0050】(操作方法) 生理食塩水(0.85%)を試料とし、L-BAPNA、D、L-BAPNAの反応タイムコースを比較した。前記試料20μl、緩衝液(R1)200μlおよび酵素液(R2)100μlを混合し、37℃で5分間保温した後、前記基質溶液(R3)100μlを添加して、反応を開始した。そして、37℃に保温して2分間の吸光度(405nm)変化を自動分析装置で測定し、相対吸光度(ΔO.D.)を求めた。この結果を、図1のグラフに示す。また、D、L

(緩衝液R1: pH8.1)
トリエタノールアミン塩酸塩
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
界面活性剤

但し、界面活性剤の酵素反応液中の濃度(最終濃度)は、前記濃度の1/2となる。また、対照(Ref)として界面活性剤濃度0重量%の緩衝液も調製し実験に供

(酵素液R2: pH3.0)
トリプシン
HCl

【0055】(基質液R3) 約70℃に加熱した水に、4.0g/Lの割合でL-BAPNAを溶解することにより調製した。

【0056】(操作方法) UTI(ミラクリッド、持田製薬社製、以下同じ)の生理食塩水溶液として、0U/ml、5U/ml、10U/mlおよび20U/mlの4種類の濃度のものを用意し、これを試料とした。つぎに、前記試料20μl、緩衝液(R1)200μlおよび酵素液(R2)100μlを混合し、37℃で5分間保温した後、前記基質溶液(R3)100μlを添加し

1、R2、R3)の調製は、本発明の測定方法の説明において述べた方法により行うことができ、また各組成およびその割合等は、測定方法の箇所で述べたとおりである。この測定キットを用いることにより、UTI等のタンパク質分解酵素阻害物質の測定を簡便にかつ迅速に行うことができる。

【0045】つぎに、実施例について説明する。

【0046】(実施例1) 緩衝液(R1)、酵素液(R2)および基質溶液(R3)を前述の方法により調製した。その組成を下記に示す。

【0047】

0.5mol/L
150mg/L

50mg/L
1mmol/L

-BAPNA(シグマ社製、以下同じ)を用いた他は、前記と同一の条件および操作により測定を行った。この結果も、図1のグラフに示す。

【0051】図1のグラフから、L-BAPNAを用いると、D、L-BAPNAを用いた場合より測定感度が向上することがわかる。

【0052】(実施例2) 下記に示すように、4種類の界面活性剤(TRITON X-405、TRITON X-100、Tween20、CHAPSの4種類)を用いてUTIの測定をそれぞれ行った。以下に試薬(R1、R2、R3)の組成および操作方法を示す。

【0053】

0.5mol/L
150mg/L
0.1、0.4重量%

した。

【0054】

50mg/L
1mmol/L

て、反応を開始した。そして、37℃に保温して2分間の吸光度(405nm)変化を自動分析装置で測定し、相対吸光度(ΔO.D.)を求めた。この結果を、各界面活性剤ごとに図2の4つのグラフに示す。

【0057】図2の4つのグラフに示すように、界面活性剤を緩衝液中に配合して使用すると、UTIの測定感度が向上することが分かる。また、一般に、界面活性剤の濃度を上げればUTI測定感度も向上する傾向が確認できた。

【0058】(実施例3) 下記に示すように、界面活性

剤を添加する試薬の種類を変えて、UTIの測定を行った。 【0059】

処方A：緩衝液R1に界面活性剤を添加

(緩衝液R1：pH8.1)

トリエタノールアミン塩酸塩

0.5mol/L

CaCl₂・2H₂O

150mg/L

TRITON X-405

2g/L

但し、界面活性剤の酵素反応液中の濃度（最終濃度）は、前記濃度は0.1重量%となる。以下の処方Bおよび処方Cも同じである。

(酵素液R2：pH3.0)

トリアシン

50mg/L

HCl

1mmol/L

(基質液R3)約70℃に加熱した水に、4.0g/Lの割合でL-BAPNAを溶解することにより調製した。 【0060】

処方B：酵素液R2に界面活性剤を添加

(緩衝液R1：pH8.1)

トリエタノールアミン塩酸塩

0.5mol/L

CaCl₂・2H₂O

150mg/L

(酵素液R2：pH3.0)

トリアシン

50mg/L

HCl

1mmol/L

TRITON X-405

4g/L

(基質液R3)約70℃に加熱した水に、4.0g/Lの割合でL-BAPNAを溶解することにより調製した。 【0061】

処方C：基質溶液R3に界面活性剤を添加

(緩衝液R1：pH8.1)

トリエタノールアミン塩酸塩

0.5mol/L

CaCl₂・2H₂O

150mg/L

(酵素液R2：pH3.0)

トリアシン

50mg/L

HCl

1mmol/L

(基質液R3)約70℃に加熱した水に、L-BAPNA(4.0g/L)およびTRITON X-405(4g/L)を溶解することにより調製した。 【0062】

処方D：界面活性剤無添加

(緩衝液R1：pH8.1)

トリエタノールアミン塩酸塩

0.5mol/L

CaCl₂・2H₂O

150mg/L

(酵素液R2：pH3.0)

トリアシン

50mg/L

HCl

1mmol/L

(基質液R3)約70℃に加熱した水に、L-BAPNA(4.0g/L)を溶解することにより調製した。

【0063】(操作方法)UTIの生理食塩水溶液として、0U/ml、5U/ml、10U/ml、および20U/mlの4種類の濃度のものを用意し、これを試料とした。つぎに、前記試料20μl、緩衝液(R1)200μlおよび酵素液(R2)100μlを混合し、37℃で5分間保温した後、前記基質溶液(R3)100μlを添加して、反応を開始した。そして、37℃に保温して2分間の吸光度(405nm)変化を自動分析装置で測定し、相対吸光度(ΔO.D.)を求めた。この結果を、図3のグラフに示す。

【0064】図3のグラフに示すように、緩衝液R1および酵素液R2に添加した処方A、Bでは、無添加の処方Dに比べ、UTIの測定感度が向上したことが分かる。しかし、基質溶液R3に添加した処方Cでは、無添加の処方Dに比べ、UTIの測定感度が低下した。このことから、酵素反応液調製前において基質と共存させなければ、界面活性剤を添加するとUTIの測定感度は向上するといえる。

【0065】(実施例4)下記に示すように、基質溶液R3の組成を変えてUTIの測定を行った。また、緩衝

(緩衝液R1: pH8.1)

トリエタノールアミン塩酸塩

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

【0067】

(酵素液R2: pH3.0)

トリアシン

HCl

【0068】(基質液R3)

・処方(0)

約70℃に加温した水に、D, L-BAPNA (1.0 g/L)を溶解することにより調製した。

・処方(1)

まず、D, L-BAPNAをDMSOに溶解し、これを界面活性剤(CHAPSO)水溶液で希釈することにより調製した。なお、前記各成分の溶液中の最終濃度は、D, L-BAPNAが4 g/L、DMSOが10重量%、CHAPSOが1重量%である。

・処方(2)

D, L-BAPNAに代えてL-BAPNAを用いた他は、処方(1)と同様に調製した。

・処方(3)

D, L-BAPNAに代えてL-BAPNAを4 g/Lの割合で用いた他は、処方(0)と同様に調製した。

・処方(4)

約70℃に加温した水に、L-BAPNA (4.0 g/L)を溶解することにより調製した。そして、この処方(4)では、CHAPSOを緩衝液R1に0.5重量%の割合で添加した。

【0069】(操作方法)UTIの生理食塩水溶液として、0 U/ml、6.25 U/ml、12.5 U/ml、25 U/ml、50 U/mlおよび100 U/mlの6種類の濃度のものを用意し、これを試料とした。つぎに、前記試料20 μl、緩衝液(R1)200 μlおよび酵素液(R2)100 μlを混合し、37℃で5分間保温した後、前記基質溶液(R3)100 μlを添加して、反応を開始した。そして、37℃に保温して2分間の吸光度(405 nm)変化を自動分析装置で測定し、相対吸光度(ΔO.D.)を求めた。この結果を、図4のグラフに示す。

【0070】図4のグラフAは、5つの処方(0、1、2、3、4)の結果を全て示したグラフであり、同図グラフBは処方(1)および処方(4)を示したグラフで

液R1および酵素液R2の組成も下記に示す。

【0066】

0.5 mol/L

150 mg/L

50 mg/L

1 mmol/L

ある。これらから分かるように、従来法である3つの処方(0、1、2)に比較して、本発明の処方である処方(3)および処方(4)によったUTI測定感度は高かった。特に、L-BAPNAを用い、界面活性剤を緩衝液R1に配合した処方(4)のUTI測定感度は極めて高かった。

【0071】

【発明の効果】以上のように、本発明のタンパク質分解酵素阻害物質の測定方法によれば、DMSO等の有機溶媒を用いる以上に基質濃度を高めることができ、また測定感度も向上することができる。このため、本発明の測定方法の適用により、タンパク質分解酵素阻害物質を迅速かつ簡便に高感度で測定できるため、例えば、感染症等の有用な指標となりうるUTIを臨床医療等の分野で十分に活用することが可能となる。また、前述のように、本発明の測定方法は、有機溶媒を用いることがないため基質溶液の調製工程の簡略化ができ、またプラスチックセルの損傷も生じず、さらに有機溶媒を用いないことは材料コストの低減にもつながる。このため、本発明の測定方法は、自動分析機を用いた検査等に容易にしかも低コストで適用することができる。

【図面の簡単な説明】

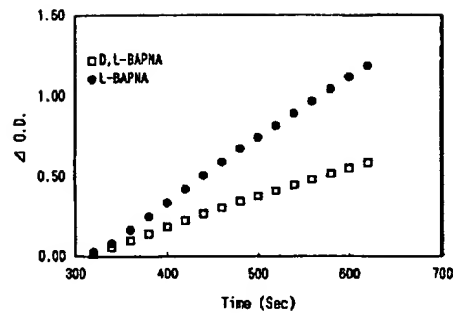
【図1】本発明の測定方法の一実施例において、L-BAPNAおよびD, L-BAPNAを用いて感度比較を行った結果を示すグラフである。

【図2】本発明の測定方法のその他の実施例において、各種界面活性剤を用いてUTIの測定を行った結果を示すグラフである。

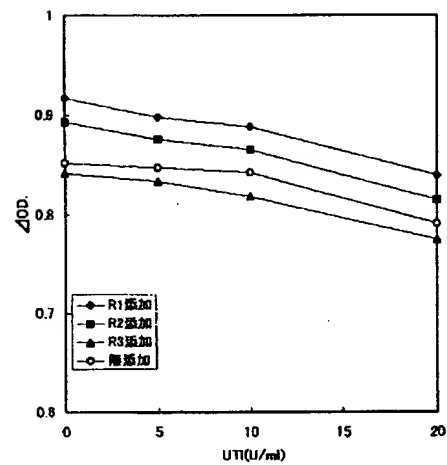
【図3】本発明の測定方法のさらにその他の実施例において、界面活性剤を添加する試薬の種類を変えてUTIの測定を行った結果を示すグラフである。

【図4】グラフAおよびグラフBは、本発明の測定方法の一実施例において、基質溶液を5種類の処方で調製してUTIの測定を行った結果を示すグラフである。

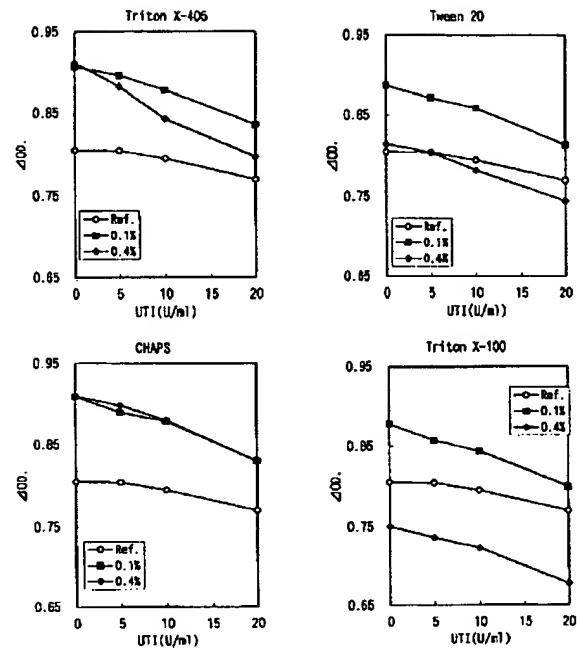
【図1】



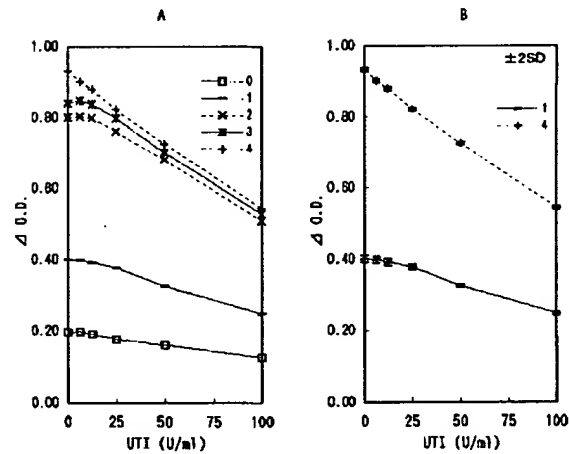
【図3】



【図2】



【図4】



0: 0.25g/L D,L-BAPNA
 1: 1g/L D,L-BAPNA, 2.5%-DMSO, 0.25%-CHAPS
 2: 1g/L L-BAPNA, 2.5%-DMSO, 0.25%-CHAPS
 3: 1g/L L-BAPNA
 4: 1g/L L-BAPNA, 0.25%-CHAPS (R1添加)